

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002198

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2005 001 889.0
Filing date: 14 January 2005 (14.01.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 23 March 2005 (23.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15 MAR 2005



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2005 001 889.0

Anmeldetag: 14. Januar 2005

Anmelder/Inhaber: SIRS-Lab GmbH, 07745 Jena/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz eines Proteins, das nicht methylierte CPG-Motive enthaltende DNA spezifisch bindet

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. März 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

Patentanwälte

GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys

MÜNCHEN – JENA

Büro München / Munich Offices:

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (0 89) 5 46 15 20 · Telefax: (0 89) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (0 36 41) 2 91 50 · Telefax: (0 36 41) 2 91 51 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

SIRS-Lab GmbH
Anwaltsakte: PAT 3696/031

14. Januar 2005

Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz eines Proteins, das nicht methylierte CPG-Motive enthaltende DNA spezifisch bindet

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität- und effizienz eines Proteins, das nicht-methylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) einer DNA bindet, die Verwendung des Verfahrens zur Trennung und/oder Anreicherung von DNA, die nicht-methylierte CpG-Motive enthält sowie einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

10

Durch Bakterien verursachte Infektionen sind eine der häufigsten Ursachen für Entzündungskrankheiten. Zur Prognose des Krankheitsverlaufes sowie insbesondere zur rechtzeitigen Auswahl geeigneter therapeutischer Maßnahmen ist der frühzeitige Nachweis der bakteriellen Erreger von entscheidender Bedeutung.

15

Zum Nachweis bakterieller Erreger werden auch heute noch hauptsächlich verschiedene kulturabhängige Methoden angewendet. Aktuelle Studien verdeutlichen jedoch die mangelnde Eignung von kulturabhängigen Methoden zum Erregernachweis (Hellebrand W., König-Bruhns C., Hass W., Studie zu Blutkulturdagnostik im Jahr 2002, Poster Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen 2004; Straube E (2003) Sepsis – microbiological diagnosis: Infection 31:284). Demnach konnten nur bei ca. 15-16% aller untersuchten Blutkulturen die Erreger ermittelt werden. Die Nachteile dieser Methoden führten dazu, daß gerade in der letzten Dekade parallel zur stürmischen technologischen Entwicklung der Molekularbiologie verstärkt nach Alternativen gesucht wurde. Erste Berichte zum Einsatz

20

kulturunabhängiger Nachweisverfahren bakterieller Erreger, welche auf dem Prinzip der Polymerasenkettreaktion (PCR) beruhen, stammen vom Anfang der 90er Jahre. So konnten beispielsweise Miller und Kollegen (Miller N J Clin Microbiol. 1994 Feb;32(2):393-7) zeigen, dass kulturunabhängige Verfahren den klassischen Kultivierungs- und Mikroskopietechniken beim Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* überlegen sind. In letzter Zeit haben aber weitere molekularbiologische Methoden, die auf dem Nachweis erregerspezifischer

25

30

Nukleinsäuren basieren, an Bedeutung gewonnen (z.B. M. Grijalva et al. Heart 89 (2003) 263-268; Uyttendaele M et al. Lett Appl Microbiol. 2003;37(5):386-91; Saukkoriipi A et al. Mol Diagn. 2003 Mar;7(1):9-15; Tzanakaki G et al. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Oct 24;39(1):31-6;).

5

Neben der hohen Spezifität solcher molekularbiologischer Methoden ist der geringe Zeitbedarf als wesentlicher Vorteil gegenüber konventionellen kulturabhängigen Methoden zu nennen. Allerdings ist die Sensitivität des Nachweises prokaryonter DNA direkt aus Körperflüssigkeiten und nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial im Vergleich zur Kultur der Mikroorganismen bislang viel zu gering. Eine für den direkten Erregernachweis aus nicht vorbehandeltem Untersuchungsmaterial ausreichende Menge an Nukleinsäuren von Bakterien wird auch im Bereich der 16S-rRNA-Analyse, mittels PCR der 16S Region auf dem bakteriellen Chromosom und der anschließenden Sequenzanalyse des PCR Fragmentes, nur eingeschränkt erreicht, da sich meist mehrere Kopien für den die 16S-rRNA kodierenden Abschnitt auf dem Chromosom befinden. Der direkte spezifische Erregernachweis mittels 16S-rRNA Analyse setzt voraus, dass sich nur eine Erreger-Spezies in der zu untersuchenden Probe befindet. Befinden sich verschiedene Erreger-Spezies in der Probe, ist ein spezifischer Nachweis über Sequenzierung der 16S-rRNA Region nicht möglich, da die verwendeten Primer universell für die meisten Bakterien sind. Weiterhin ist für den Erregernachweis mittels 16S-rRNA-Analyse Voraussetzung, dass sich die nachzuweisenden Bakterien in der metabolischen Phase befinden und genügend 16S-rRNA exprimieren. Davon ist insbesondere bei Patienten, die unter einer kalkulierten antibiotischen Therapie stehen, in der Regel nicht auszugehen.

Darüber hinaus kommen bestimmte Pathogenitätsfaktoren von Bakterien nicht zu jeder Zeit zur Expression, obwohl die entsprechenden Gene im bakteriellen Genom vorhanden sind. Im Ergebnis werden dem klinisch tätigen Arzt falsch negative Befunde übermittelt. Dadurch kann eine gezielte antibiotische Therapie entweder gar nicht oder viel zu spät eingeleitet werden. Der Arzt ist in solchen Fällen auf sein Erfahrungswissen und allgemeine Richtlinien (wie z.B. der Paul-Ehrlich-Gesellschaft) angewiesen und wird daher viel zu allgemein antibiotisch behandeln. Der nicht zielgenaue Einsatz von Antibiotika birgt eine Reihe von Risiken nicht nur für den einzelnen Patienten (wie z.B. unnötige Nebenwirkungen in Form von Nierenschäden etc.), sondern auch für die gesamte Gesellschaft (z.B. die Entwicklung zusätzlicher Antibiotikaresistenzen wie MRSA (Methicillinresistente *Staphylokokkus aureus*, etc.). Deshalb bietet der Nachweis der klinisch bedeutsamen Pathogenitätsfaktoren und Resistzenzen von Bakterien auf chromosomaler und Plasmid-Ebene, also letztendlich auf DNA-Ebene, für die Diagnose vieler Infektionserkrankungen, aber auch der Sepsis, erhebliche Vorteile. Dies gilt um so mehr, da auf dieser Ebene auch eine Unterscheidung zwischen pathogenen und konsensalen Bakterien getroffen werden kann.

Am häufigsten erfolgt der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis durch Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), wie beispielsweise die Vervielfältigung der prokaryonten DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. der Ligase-Kettenreaktion (LCR). Der hohen Spezifität und schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse stehen die Störanfälligkeit durch Kontaminationen oder stark reaktionshemmende Faktoren in klinischen Proben gegenüber.

Bei einem herkömmlichen PCR-Nachweisverfahren muß für eine erfolgreiche Detektion von Erregern im Blut theoretisch mindestens 1 Target-DNA des Erregers in 10 µl Blut vorhanden sein. Das entspricht ca. 100 Targets in 1 ml Blut bzw. 1000 Targets in 10 ml Blut.

Anders verhält es sich bei der Blutkultur zum Nachweis von Erregern einer Infektion. Hier liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 3-5 Bakterien pro 10 ml Blut.

Diese Nachweisgrenze wird derzeit mit PCR-Verfahren noch nicht erreicht, auch nicht mit solchen, die ihre Zielsequenz im Bereich der 16S-rRNA Region auf dem Chromosom haben. Obwohl mehrere die 16S rRNA kodierende Regionen auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sind, meist 3 bis 6, bleibt die Voraussetzung, daß sich mindestens ein Molekül der Template-DNA im PCR-Reaktionsgemisch befindet, unerfüllt.

Eine verbesserte diagnostische Sicherheit ist von PCR-Verfahren zu erwarten, deren spezifische Zielsequenzen für speziesspezifische Proteine kodieren, entweder im Chromosom oder auf Plasmiden der Mikroorganismen. Auch hier trifft das Obengesagte zur Nachweisgrenze zu. Gerade unter dem Einfluß einer laufenden Antibiotikatherapie kann das Wachstum der Erreger stark verlangsamt, eingeschränkt oder blockiert sein, auch wenn das eingesetzte Antibiotikum letztlich nicht optimal wirksam ist. Diese Situation ist gerade bei solchen Patienten häufig anzutreffen, die bereits unter Antibiotikatherapie stehen und bei denen aus diesem Grund keine krankheitsverursachenden Bakterien aus den Blutkulturen oder anderen Proben (wie z.B. Trachealabstrichen, bronchoalveolären Lavagen (BAL) etc.) angezüchtet werden können.

Wegen unzureichender Sensitivität hat der erregerspezifische Nukleinsäurenachweis ohne Amplifikationsschritt durch direkten Nachweis der prokaryonten DNA (Sondentechnik, FISH-Technik) nur bei ausreichend hoher Keimzahl im Untersuchungsmaterial diagnostische Bedeutung.

Die wesentliche Problematik des Nachweises prokaryonter DNA zur Identifikation bakterieller Erreger in Körperflüssigkeiten bestehen neben PCR-hemmenden Bestandteilen im

Untersuchungsmaterial vor allem in der geringen Konzentration prokaryonter DNA und den damit einhergehenden Überschuß eukaryonter gegenüber prokaryonter DNA. Hierbei sind insbesondere kompetitive Prozesse bei der DNA-Analyse sowie die geringe Menge an prokaryonter DNA als hinderlich für einen qualitativen und quantitativen Erreger nachweis anzusehen.

Die üblichen Methoden zur DNA-Isolierung reichern die Gesamt-DNA einer Körperflüssigkeit an, so daß das Verhältnis Wirts-DNA zu mikrobieller DNA zwischen 1:10⁻⁶ und 1:10⁻⁸ betragen kann. Aus diesem Unterschied ist die Schwierigkeit des Nachweises mikrobieller DNA in Körperflüssigkeiten gut nachzuvollziehen.

Prokaryonte DNA unterscheidet sich von eukaryonter DNA beispielsweise durch das Vorkommen nicht-methylierter CpG-Motive (Hartmann G et al., Deutsches Ärzteblatt, Jg. 98/15: A981-A985 (2001). In der prokaryonten DNA befinden sich CpG-Motive in einem 16-fachen Überschuß im Vergleich zu eukaryonter DNA, die solche Motive nur übergangsweise enthält, z.B. in Krebszellen oder Promotorregionen. In prokaryonter DNA sind diese Motive nicht-methyliert, wohingegen sie in eukaryonter DNA zum größten Teil methyliert sind, was die Unterschiedlichkeit nochmals erhöht. Nicht-methylierte CpG-Motive sind nicht-methylierte Deoxycytidylat-Deoxyguanyl-Dinucleotide innerhalb des prokaryonten Genoms oder innerhalb von Fragmenten desselben.

Es ist weiterhin bekannt, dass aus unterschiedlichen Methylierungsmustern innerhalb der humanen DNA diagnostische Aussagen für Krebserkrankungen ableiten lassen (Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment (Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 983) Editor: Mukesh Verma ISBN 1-57331-431-5). Anhand von methylierten und nicht-methylierten Cytosinen im Genom lassen sich gewebe-, aber auch krankheitsspezifische Muster identifizieren. Die spezifischen Methylierungsmuster für eine Krankheit ermöglichen zum einen eine Diagnose zu einem sehr frühen Zeitpunkt, zum anderen auch molekulare Klassifikation einer Krankheit und die wahrscheinliche Reaktion eines Patienten auf eine bestimmte Behandlung. Ausführliche Informationen hierzu können beispielsweise aus Beck S, Olek A, Walter J.: From genomics to epigenomics: a loftier view of life., Nature Biotechnology 1999 Dec;17(12):1144, der Homepage der Epigenomics AG (<http://www.epigenomics.de>) oder aus WO 200467775 entnommen werden.

In Cross et al. wurde gezeigt, dass es möglich ist, unterschiedlich methylierte genomische humane DNA zu trennen, indem die methylierte CpG-Motive an ein Protein gebunden werden (Cross SH, Charlton JA, Nan X, Bird AP, Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column, Nat Genet. 1994 Mar;6(3):236-44). Dieses Verfahren dient also zur Bindung

methylierte CpG-Motive enthaltende DNA. Eine ausreichende Trennung von nicht-methylierter und methylierter DNA ist aus technischen Gründen nicht möglich, da dass verwendete Protein auch nicht-methylierte DNA schwach bindet. Auch eine Anreicherung von nicht-methylierter DNA ist mit diesem Verfahren nicht möglich, da die Kapazität des verwendeten Proteins nicht ausreicht, um bei einem hohen Überschuss an methylierter DNA in ausreichendem Maße von nicht-methylierter DNA zu trennen. Weiterhin bleibt durch die Bindung der methylierten DNA das Ausgangsvolumen in welchem sich die nicht-methylierte DNA befindet unverändert, so dass keine Anreicherung erreicht wird.

Es wäre also wünschenswert, die nicht-methylierte DNA von methylierter DNA zu trennen und nicht-methylierte DNA anreichern zu können, um somit prokaryonter von eukaryonter DNA bzw. unterschiedlich methylierte humane DNA voneinander zu trennen.. Es wäre zudem wünschenswert und von hohen gesundheitsökonomischen Interesse, dass die Trennung und Anreicherung von nicht-methylierter DNA auch aus einem Gemisch (beispielsweise Vollblut) erreicht werden könnte, dass durch einen hohen Überschuß an methylierter DNA charakterisiert ist.

Aus Voo et al. ist bekannt, dass das humane CpG-bindende Protein (hCGBP) in der Lage ist, nichtmethylierte CpG-Motive zu binden. Die Publikation beschreibt den transkriptionsaktivierenden Faktor hCGBP, von dem gezeigt wurde, dass er eine Rolle in der Regulation der Expression von Genen innerhalb von CpG-Motiven spielt.

In EP 02020904 wurde ein Verfahren gezeigt, das die Trennung und Anreicherung von prokaryonter DNA aus einem Gemisch aus prokaryonter und eukaryonter DNA durch Bindung der prokaryonten DNA an ein spezifisch nicht-methylierte DNA bindendes Protein ermöglicht. Aus der nicht veröffentlichten Deutschen Patenanmeldung (Aktenzeichen des DPMA 10 2004 010 928.1-41) und aus Sachse S. et al. (Using a DNA-binding protein to enrich prokaryotic DNA from a mixture of both, eukarotic and prokaryotic DNA, Poster Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen 2004) ist bekannt, dass die Bindung nicht-methylierter CpG-Motive durch das rekombinant herstellte Protein CpGbP-181 mit der SEQ-ID. Nr.1 erreicht werden kann.

Es wurde gezeigt, dass das CpGbP-181-Protein direkt an eine Matrix gekoppelt wurde. In Sachse et al. wurde das CpGbP-181-Protein direkt an bromcyanaktivierte Sepharose gekoppelt.

Die direkte Bindung des CpGbP-181-Proteins führt jedoch zu einer ungerichteten Bindung dieses Proteins über die gesamte Oberfläche der Matrix. Daraus resultiert eingeschränkte

Beweglichkeit des Proteins auf der Oberfläche der Matrix. Weiterhin kann die direkte Bindung des Proteins an die Matrix eine optimale Faltung dieses Proteins verhindern und die Zahl der freien Bindungsstellen reduzieren.

- 5 Die mit der direkten Kopplung des CpGbP-181-Proteins an eine Matrix einhergehenden Nachteile führen schließlich zu einer reduzierten Bindungskapazität und- effizienz für die nicht-methylierten CpG-Motive einer DNA.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, dass die Bindungskapazität – und effizienz eines Proteins, dass spezifisch nicht-methylierte CpG-motive enthaltende DNA bindet und eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtypprotein-CGPB-Protein aufweist und gegenüber diesem verkürzt ist wobei die Bindungsstelle für nicht-methylierte CpG-Motive erhalten bleibt, erhöht und somit eine verbesserte Trennung und/oder Anreicherung nicht-methylierter DNA aus einem Gemisch von methylierter DNA und nicht-methylierter DNA ermöglicht.

15 Im folgenden wird die Erfindung am Beispiel des rekombinant herstellten CpGbP-181-Proteins gemäß SEQ-ID Nr. 1 beschrieben. Die auf das Protein CpGbP-181 mit der SEQ-ID Nr.1 bezogene Beschreibung der Erfindung stellt keine Einschränkung sondern nur eine 20 beispielhafte Anwendung dar.

Erfindungsgemäß wird dies durch die indirekte Kopplung des Proteins an die Matrix erreicht. Die Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, dass durch eine indirekte Bindung des CpGbP-181-Proteins die Bindungskapazität und -effizienz erhöht wird.

25 Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die Figuren 1 und 2 beschrieben, wobei

Figur 1 Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryontischer DNA aus DNA-Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von 30 gekoppeltem CpGbP-181-Protein an CNBr- Sepharose und

Figur 2 Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryontischer DNA aus einem DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und humaner DNA unter 35 Verwendung von gekoppeltem CpGbP-181-Protein an AH- Sepharose

darstellen.

Zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz des CpGbP-181-Proteins für nicht-methylierte CpG-Motive ist Gegenstand dieser Erfindung ein Verfahren zur indirekten Bindung des Proteins an die Matrix über einen Spacer. Durch die Kopplung des Proteins über einen Spacer an die Matrix wird der Grad der Beweglichkeit sowie die Anzahl der freien Bindungsstellen des CpGbP-181-Proteins erhöht. Dadurch wird eine Steigerung der Bindungskapazität- und effizienz erreicht. Weiterhin kann dadurch die Menge des eingesetzten Proteins reduziert werden.

Als Spacer im Sinne dieser Erfindung werden Moleküle verstanden, welche einen räumlichen Abstand zwischen Matrix und dem CpGbP-181-Protein ermöglicht. Als Spacer kommen Moleküle wie Diaminhexan ($\text{NH-CH}_2)_6\text{-NH}_2$) oder andere dem Fachmann bekannte anorganische oder organische Verbindungen zum Einsatz. Antikörper sind im Sinne dieser Erfindung nicht als Spacer zu betrachten.

Als Matrix im Sinne dieser Erfindung werden Substanzen bezeichnet, die als Träger für Spacer und Protein fungieren. Trägermaterialien können beispielsweise Sepharose, Perlzellulose, Silica o. ä. dem Fachmann bekannte Substanzen sein.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Matrix an einen festen Träger gekoppelt sein. Diese Ausführungsform stellt eine besonders einfache Möglichkeit der Anreicherung nicht-methylierte CpG-motive enthaltender DNA dar, da die Separation aus der Lösung besonders einfach, beispielsweise durch physikalische Entfernung (z.B. Abzentrifugation) der nicht-gebundenen Bestandteile des Gemisches aus der Lösung, erfolgen kann. Als Träger kommen dabei insbesondere Membranen, Mikropartikel und Harze oder ähnliche Materialien für Affinitätsmatrices in Frage. Geeignete Materialien zur Anbindung des erfindungsgemäßen Proteins, sowie – abhängig von der Art des Materials – die Durchführung der Anbindung, sind dem Fachmann hinlänglich bekannt.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird Sepharose als Matrix verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform wird Diaminohexan-Rest (- $\text{NH-(CH}_2)_6\text{-NH-}$; auch als AH bezeichnet) als Spacer verwendet.

Aufgrund der gesteigerten Bindungskapazität und -effizienz ist weiterhin Gegenstand dieser Erfindung ein Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung von nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA mit den Schritten

- a) Kopplung des CpGbP-181-Proteins über einen Spacer an eine Matrix

- b) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA mit dem CpGbP-181-Protein, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird, und
- c) Separation des Komplexes.

5 Die Bezeichnung „nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA“ bezieht sich dabei sowohl auf eukaryonte als auch prokaryonte DNA. Diese kann aufgereinigt und wieder in Lösung gebracht sein (z.B. aus Geweben isolierte nicht-methylierte DNA) oder direkt in der Ursprungsquelle (z. B. Körperflüssigkeit, wie Blut, Serum, Trachealaspirat, Urin, 10 bronchiale Lavage, Nasenabstrich, Hautabstrich, Punktionsflüssigkeit) vorliegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA prokaryonte, insbesondere bakterielle DNA.

15 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA humane, genomische DNA.

Die Separation kann mittels verschiedener Verfahren zur Trennung, Isolierung oder Anreicherung von DNA-Protein-Komplexen oder DNA-Polypeptid-Komplexe erfolgen, die dem Fachmann hinlänglich bekannt sind. Dabei werden bevorzugt Methoden angewendet, bei denen 20 das DNA-bindende Protein an einen Träger immobilisiert ist oder wird, um die DNA aus der Probelösung zu trennen und/oder anzureichern.

25 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform schließt sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der DNA vom CpGbP-181-Protein aus dem Komplex an. Dies kann beispielsweise durch herkömmliche Verfahren zur DNA-Aufreinigung erfolgen, die dem Fachmann bekannt sind. Im einfachsten Falle beruht die Abtrennung auf der Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration (z. B. auf 1 M NaCl) des Mediums/Puffers oder der Zufügung chaotoper Reagenzien, etc; also geeignete Parameter, die zur Auflösung des Protein-DNA-Komplexes 30 führen. Solche Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Für die Lösung für nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA kommt grundsätzlich jedes geeignete Lösungsmittel in Frage. Besonders zweckmäßig ist das Verfahren jedoch zur Anreicherung nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA aus Lösungen, die verschiedene 35 biomolekulare Spezies, insbesondere verschiedenen Arten von DNA, enthalten.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung prokaryonter DNA aus einem Gemisch von prokaryonter und eukaryonter DNA. Dabei wird beispielsweise

die in Körperflüssigkeiten befindliche prokaryonte DNA durch spezifische Bindung an das erfundungsgemäße Protein von der eukaryonten DNA getrennt und angereichert. Die so angereicherte prokaryonte DNA erleichtert den Nachweis prokaryonter Erreger mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und kann zur Diagnose von Krankheiten, die durch pathogene 5 Erreger verursacht werden, beitragen.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Trennung und Anreicherung von nicht-methylierten genomischen DNA aus einem Gemisch von nicht-methylierter genomischer und methylierter genomischer DNA. Durch die Bindung der nicht-methylierten genomischen DNA an 10 das über einen Spacer an eine Matrix gekoppelte CpGbP-181-Protein wird die methylierte genomische DNA abgetrennt. Diese Verfahrensweise trägt wesentlich zur vereinfachten Untersuchung der Methylierungsmuster von methylierter genomischer DNA bei und ermöglicht die Diagnose von Krankheiten, die ein spezifisches Methylierungsmuster aufweisen.

15 Als Körperflüssigkeiten im Sinne der Erfindung werden alle vom Körper eines Säugers, einschließlich Mensch, stammenden Flüssigkeiten verstanden, insbesondere solche in denen Krankheitserreger vorkommen können, wie z. B. Blut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal- sowie Synovialflüssigkeit. Die auf humanes Blut bezogene Beschreibung der Erfindung stellt keine Einschränkung sondern nur eine beispielhafte Anwendung dar.

20 Unter bakteriellen Erregern werden vorzugsweise Erreger einer Sepsis, aber auch alle anderen bakteriellen Erreger von Infektionen verstanden. Sie können sich dabei von karmensalen Erregern unterscheiden, die zur normalen Besiedlung des Organismus gerechnet werden und gelegentlich auch in Untersuchungsproben von Patienten gefunden werden, aber keine 25 klinische Bedeutung haben.

Eine weitere Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und 30 Anreicherung nicht-methylierte CpG-motive enthaltende DNA von methylierter DNA durch Bindung der nicht-methylierten CpG-motive enthaltenden DNA an das CpGbP-181-Protein welches an Mikropartikeln immobilisiert wurde. Hierbei kommen alle Mikropartikel in Frage, die eine Immobilisierung des DNA-bindenden erfundungsgemäßen Proteins ermöglichen. Solche Mikropartikel können aus Latex, Kunststoff (z. B. Styropor, Polymer), Metall oder ferromagnetischen Stoffen bestehen. Weiterhin können auch fluoreszierende Mikropartikel, wie sie beispielsweise von der Firma Luminex angeboten werden, verwendet werden. Nachdem die 35 nicht-methylierte CpG-motive enthaltende DNA an die an Mikropartikel immobilisierten erfundungsgemäßen Proteine gebunden wurde, werden die Mikropartikel mit geeigneten Methoden, wie beispielsweise Filtration, Zentrifugation, Fällung, Sortierung über Messung der Fluoreszensintensität oder magnetische Verfahren, von dem Stoffgemisch getrennt. Die nicht-

methylierte CpG-motive enthaltende DNA steht nach Trennung von den Mikropartikeln zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

Eine andere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und
5 Anreicherung von nicht-methylierte CpG-motive enthaltender DNA durch Bindung der nicht-
methylierte CpG-motive enthaltende DNA an das CpGbP-181-Protein, welches anschließend
durch Elektrophorese von übrigen Bestandteilen des Gemisches getrennt wird.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Trennung und
10 Anreicherung nicht-methylierte CpG-motive enthaltender DNA von methylierter DNA durch
Bindung der nicht-methylierte CpG-motive enthaltende DNA an das CpGbP-181-Protein, wobei
das CpGbP-181-Protein anschließend an entsprechende Antikörper gebunden wird. Die
Antikörper können an feste oder flexible Substrate, z. B. Glas, Kunststoffe, Silizium,
15 Mikropartikel, Membranen gebunden sein, oder sich in Lösung befinden. Nach Bindung der
nicht-methylierte CpG-motive enthaltenden DNA an das CpGbP-181-Protein und dessen
Bindung an den spezifischen Antikörper erfolgt die Trennung aus dem Stoffgemisch mit dem
Fachmann bekannten Methoden.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Detektion nicht-
20 methylierte CpG-Motive enthaltender DNA. Hierbei schließt sich nach der Anreicherung der
nicht-methylierte CpG-Motive enthaltenden DNA ein Schritt zur Amplifikation dieser DNA an,
wzu sich alle gängigen Amplifikationsmethoden eignen (PCR, LCR,LM-PCR etc.).

Die Erfindung betrifft darüber hinaus einen Kit zur Trennung und/oder Anreicherung nicht-
25 methylierte CpG-Motive enthaltender DNA mittels eines der vorstehend beschriebenen
Verfahren, in dem zumindest das CpGbP-181-Protein gegebenenfalls zusammen mit weiteren
geeigneten Reagenzien zur Verfahrensdurchführung enthalten sind.

Der Kit kann neben dem CpGbP-181-Protein mindestens ein Set von Primern, welche zur
30 Amplifikation genomischer DNA bestimmter Prokaryonten unter Standardbedingungen geeignet
sind, enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere mit den vorstehend beschriebenen
Ausführungsformen hat den Vorteil, daß durch die Verwendung eines Spacers für die Kopplung
35 des CpGbP-181-Proteins DNA an eine Matrix die Bindungskapazität wesentlich gesteigert wird.
Dadurch gelingt eine erhöhte Konzentrierung von nicht-methylierte CpG-motive enthaltende
DNA, wodurch wiederum die Nachweisempfindlichkeit für Verfahren zum Nachweis von nicht-
methylierter DNA stark erhöht wird.

Beispiel

5 Das Beispiel zeigt die verbesserten Bindungseigenschaften des CpG-bP-181-Proteins, die aus der indirekten Bindung dieses Proteins über einen Spacer an eine Matrix resultieren.

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften wurde prokaryonter DNA aus DNA-Gemisch von *Staphylococcus aureus* und humarer DNA unter Verwendung des direkt gekoppeltem CpGbP-
10 181-Proteins an CNBr-Sepharose bzw. unter Verwendung des indirekt über einen Diaminohexyl-Spacer (AH) gekoppeltem CpGbP-181-Proteins an Sepharose (im folgenden AH-Sepharose) angereichert.

15 Zunächst wurde die AH-Sepharose nach Zugabe von Glutaraldehyd 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen.

20 Jetzt wurden 0,24 mg des CpGbP-181-Proteins auf die Matrix gegeben. Die Bindung des CpGbP-181-Proteins an die AH-Sepharose wurde durch eine Inkubation einer 2 Stunden bei Raumtemperatur erreicht. Das überschüssige CpGbP-181-Protein wurde entfernt.

25 Nach anschließendem Waschen der CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 und Zugabe von 0,1 molarem Glycin, wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose zur Absättigung freier Bindungsstellen 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wiederum die CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen.

30 Zur Reduktion der Schiff'schen Base und Stabilisierung der Bindung wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose mit Natriumborhydrid versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose mit 0,1 molarem Na_2HPO_4 gewaschen.

35 Die Lagerfähigkeit der CpGbP-181-AH-Sepharose bei 4°C wird durch Zugabe von 20% Ethanol erreicht. Danach wurde die CpGbP-181-AH-Sepharose in Säulen portioniert. Die mit der CpGbP-181-AH-Sepharose präparierten Säulen wurden anschließend mit TRIS-Puffer gewaschen und standen für die Trennung/Anreicherung von nicht-methylierte CpG-Motive enthaltende DNA zur Verfügung.

2) Anreicherung des DNA-Gemisches, anschließende Elution der prokaryonten DNA und Konzentrationsbestimmung der prokaryonten DNA durch PCR

Als DNA-Gemisch bestand jeweils aus 330 ng humaner DNA bzw. 150 ng prokaryonter DNA (*Staphylococcus aureus* DNA).

- 5 Die DNA-Gemische wurde auf die mit CNBr-Sepharose bzw. mit AH-Sepharose präparierten Säulen gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Säulen zentrifugiert und mit 100 µl TRIS-Puffer (10 µM, pH 7) gewaschen. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde 5 mal wiederholt.
- 10 Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und anschließend jeweils 100 µl Elutionspuffer (10 µM TRIS-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 7) auf die Säulen gegeben und zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde 5 mal wiederholt.

- Jetzt wurden die einzelnen Fraktionen jeder Probe durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl Ethanol mit anschließendem Mischen und Zentrifugieren (15 min bei 15000g) gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Pellet mit 1 µl Ethanol (70%) gewaschen und 5 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Anschließend wurde wieder der Überstand entfernt, das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen.
- 15
 - 20 Hiervon wurden jeweils 5 µl für den PCR-Nachweis verwendet. Für die PCR wurden Universalprimer für das 16s RNA Gen verwendet. Nach Durchführung der PCR wurden jeweils 15 µl der einzelnen Fraktionen auf ein 2%-iges Agarosegel gegeben.

Figur 1 (direkte Bindung des CpG-181 Proteins an CNBr- Sepharose) und Figur 2 (indirekte Bindung des CpG-181 Proteins über eine Spacer (AH) an Sepahrose) zeigen die Ergebnisse der PCR für die einzelnen Fraktionen. Es zeigt sich deutlich, dass durch die Verwendung des AH-Spacer mehr prokaryonter DNA angereichert werden konnte (Fraktion 1, Elutionsfraktion). Diese charakteristische Verbesserung der Bindungseigenschaften ist für die erfindungsgemäßen Verfahren ausnutzbar.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SIRS-Lab GmbH

5 <120> Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz eines Proteins, das nicht methylierte CPG-Motive enthaltende DNA spezifisch bindet

10 <130> Pat 3696/31

<140>
<141>

15 <160> 1
<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 181
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Gly Arg Lys Arg Pro Val Pro Asp Pro Asn Leu Gln Arg Arg
1 5 10 15

25 Ala Gly Ser Gly Thr Gly Val Gly Ala Met Leu Ala Arg Gly Ser Ala
20 25 30

30 Ser Pro His Lys Ser Ser Pro Gln Pro Leu Val Ala Thr Pro Ser Gln
35 40 45

35 His His Gln Gln Gln Gln Gln Ile Lys Arg Ser Ala Arg Met Cys
50 55 60

Gly Glu Cys Glu Ala Cys Arg Arg Thr Glu Asp Cys Gly His Cys Asp
65 70 75 80

40 Phe Cys Arg Asp Met Lys Lys Phe Gly Gly Pro Asn Lys Ile Arg Gln
85 90 95

Lys Cys Arg Leu Arg Gln Cys Gln Leu Arg Ala Arg Glu Ser Tyr Lys
100 105 110

45 Tyr Phe Pro Ser Ser Leu Ser Pro Val Thr Pro Ser Glu Ser Leu Pro
115 120 125

Arg Pro Arg Arg Pro Leu Pro Thr Gln Gln Gln Pro Gln Pro Ser Gln
130 135 140

50 Lys Leu Gly Arg Ile Arg Glu Asp Glu Gly Ala Val Ala Ser Ser Thr
145 150 155 160

55 Val Lys Glu Pro Pro Glu Ala Thr Ala Thr Pro Glu Pro Leu Ser Asp
165 170 175

Glu Asp Leu Pro Leu
180

Patentanwälte
GEYER, FEHNER & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys
MÜNCHEN - JENA

Büro München / Munich Offices:

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (0 89) 5 46 15 20 · Telefax: (0 89) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (0 36 41) 2 91 50 · Telefax: (0 36 41) 2 91 52 1 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

SIRS-Lab GmbH
Anwaltsakte: PAT 3696/031

14. Januar 2005

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität und -effizienz eines Proteins, dass spezifisch nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA bindet und eine 25%ige bis 35%ige Homologie zum Wildtyp-CGPB-Protein aufweist und gegenüber diesem verkürzt ist, wobei die Bindungsstelle für nicht methylierte CPG-Motive erhalten bleibt, wobei die Bindung dieses Proteins über einen Spacer an eine Matrix erfolgt.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäuresequenz gemäß SEQ-ID No. 1 aufweist.
- 15 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei ein Diaminohexan-Rest als Spacer verwendet wird.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei Sepharose als Matrix verwendet wird.
- 25 5. Verfahren zur Trennung und/oder Anreicherung von nicht-methylierte CPG-Motive enthaltender DNA mit einem Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, mit den Schritten
a) Kopplung des Proteins über einen Spacer an eine Matrix
b) Kontaktieren mindestens einer in Lösung befindlichen nicht-methylierte CPG-Motive enthaltenden DNA mit dem Protein, wodurch ein Protein-DNA-Komplex gebildet wird,
und
c) Separation des Komplexes.
- 30 6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei sich an die Separation ein Schritt zur Abtrennung der nicht-methylierte CPG-Motive enthaltenden DNA vom Protein aus dem Komplex anschließt.

7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei es sich bei der nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA um prokaryonte DNA handelt.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei der prokaryonten DNA um bakterielle DNA handelt.
9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche 1-6 , wobei es sich bei der nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA um humane genomische DNA handelt.
- 10 10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüchen, wobei ein fester Träger als Matrix verwendet wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Träger als Matrix, Mikropartikel oder Membran ausgebildet ist.
- 15 12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 11, wobei die Separation mittels eines gegen das Protein gerichteten Antikörper oder Antiserum erfolgt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 12, wobei die Separation mittels Elektrophorese erfolgt.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 13, wobei die Lösung ein Gemisch aus eukaryonter und prokaryonter DNA enthält.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die Lösung eine Körperflüssigkeit oder davon abgeleitet ist, insbesondere Vollblut, Serum, Plasma, Zellpräparationen aus Vollblut, Urin, Liquor, Pleural-, Perikardial-, Peritoneal-, Synovialflüssigkeit und bronchoalveolare Lavage.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 13, wobei die Lösung ein Gemisch aus nicht methylierter humaner, genomischer DNA und methylierter humaner, genomischer DNA enthält.
- 30 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-18, wobei die Separation mittels eines Filters erzielt wird, welcher entsprechende DNA-Protein-Komplexe herausfiltert.
- 35 18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei das Protein auf einer Filtermatrix immobilisiert ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 18, wobei weiterhin nach Schritt c) als Schritt d)
die nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA amplifiziert wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, mit den Schritten:

- 5 a) Isolierung der nicht methylierten CPG-motive enthaltenden DNA aus dem Protein-DNA-Komplex,
 b) Denaturierung der doppelsträngigen DNA,
 c) Hybridisierung der Einzelstränge der DNA mit komplementären Primern,
10 d) Generierung von Doppelstrangfragmenten über Reaktion mit Polymerasen und
 e) Wiederholung dieser Schritte bis zum gewünschten Amplifikationsgrad.

21. Verfahren nach Anspruch 19, mit den Schritten:

- 15 a) Klonierung der isolierten nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA-Sequenzen in Vektoren,
 b) Transformation geeigneter Wirtszellen mit diesen Vektoren,
 c) Kultivieren dieser transformierten Zellen,
 d) Isolation der Vektoren aus diesen Zellen und
20 e) Isolierung der DNA.

22. Kit zur Trennung und/oder Anreicherung nicht methylierte CPG-motive enthaltende DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 5 bis 21.

25 23. Test-Kit zur Detektion nicht methylierter CPG-motive enthaltender DNA mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 5 bis 21 mit einem oder mehreren Sets spezifischer Primer.

30 24. Kit nach einem der Ansprüche 22 und 23, wobei das Protein nach SEQ ID No. 1 enthalten ist.

25. Kit nach Anspruch 24, wobei das über einen Spacer an eine Matrix gekoppelte Protein nach SEQ ID No. 1 enthalten ist.

Patentanwälte

GEYER, FEHNERS & PARTNER (G.b.R.)

European Patent and Trademark Attorneys

MÜNCHEN - JENA

Büro München / Munich Offices:

Perhamerstraße 31 · D-80687 München · Telefon: (0 89) 5 46 15 20 · Telefax: (0 89) 5 46 03 92 · e-mail: gefepat.muc@t-online.de

Büro Jena / Jena Offices:

Sellierstraße 1 · D-07745 Jena · Telefon: (0 36 41) 2 91 50 · Telefax: (0 36 41) 2 91 52 21 · e-mail: gefepat.jena@t-online.de

14. Januar 2005

SIRS-Lab GmbH
Anwaltsakte: PAT 3696/031

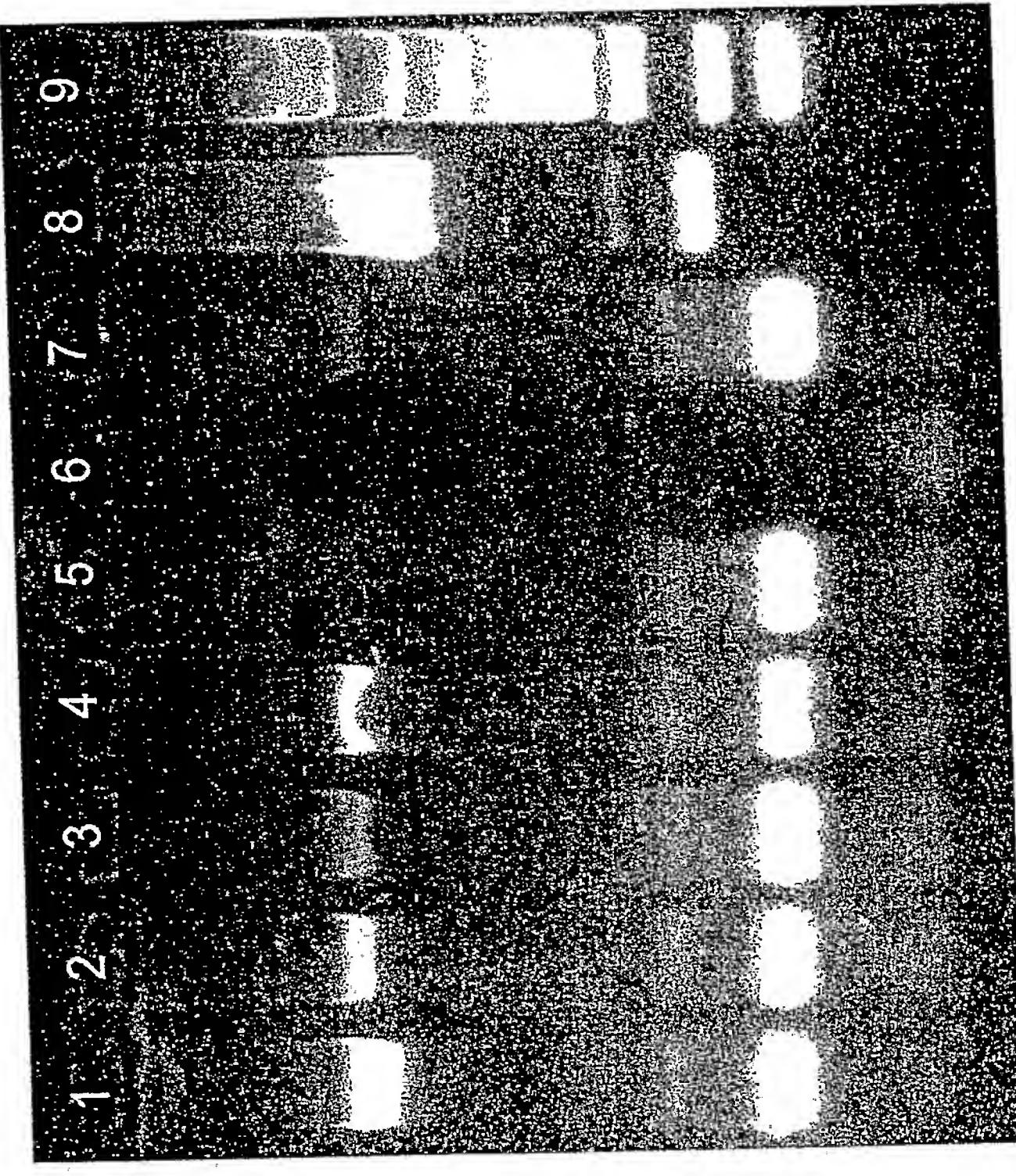
Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steigerung der Bindungskapazität- und effizienz eines Proteins, das nicht-methylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide (CpG-Motive) einer DNA bindet, die Verwendung des Verfahrens zur Trennung und/oder Anreicherung von DNA, die nicht-methylierte CpG-Motive enthält sowie einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

10

Fig. 2

Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryotischer DNA aus DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpG-181 Protein an AH- Sepharose

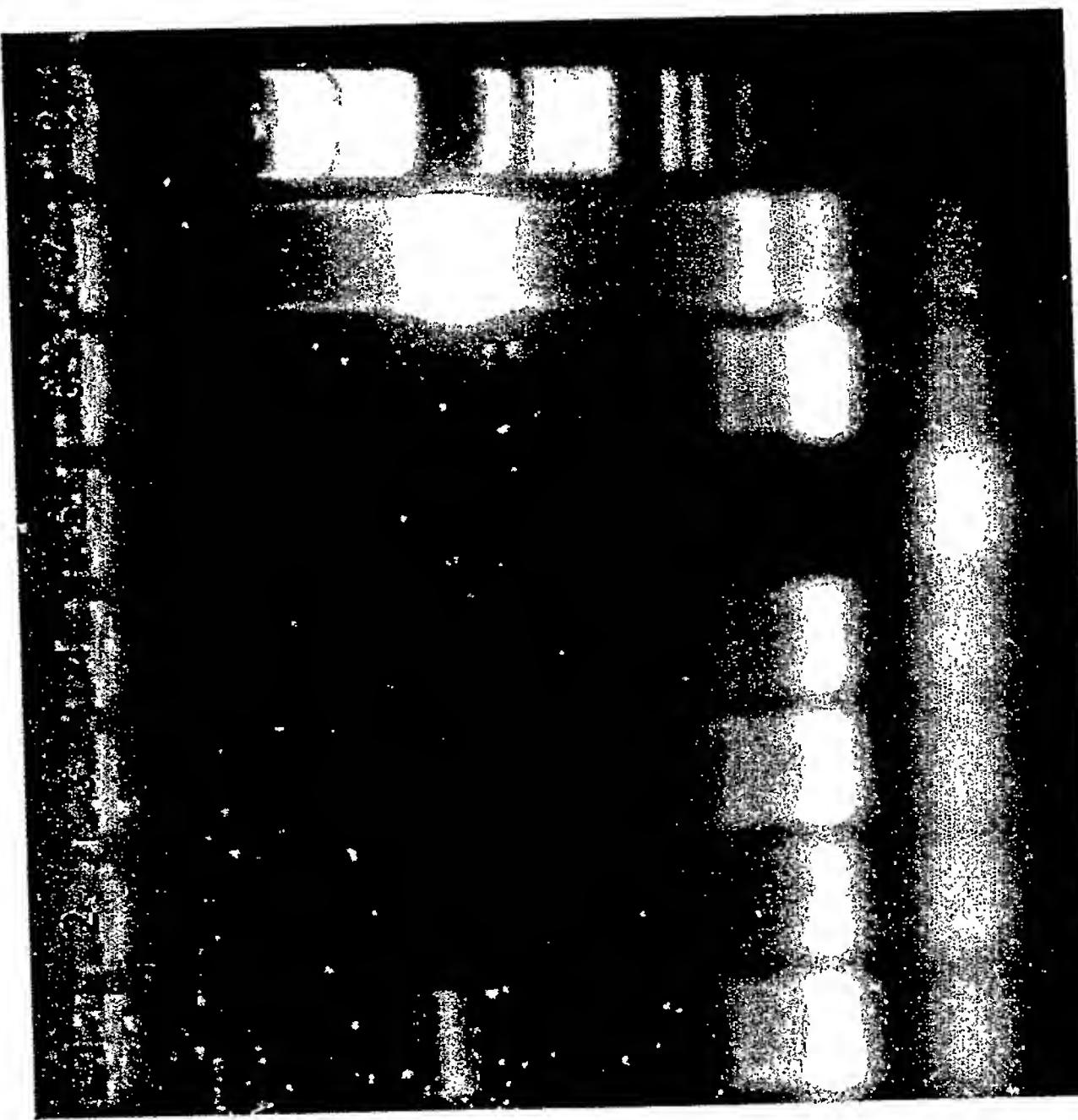


Legende:

- | | |
|--|----------------------|
| 1 E ₁ (E= Elutionsfraktion) | 6 negative Kontrolle |
| 2 E ₂ | 7 vor Säule |
| 3 E ₃ | 8 positive Kontrolle |
| 4 E ₄ | 9 BIORAD- Marker |
| 5 E ₅ | |

Figur 1

Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryotischer DNA aus DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpGbp-181 Protein an CNBr- Sepharose

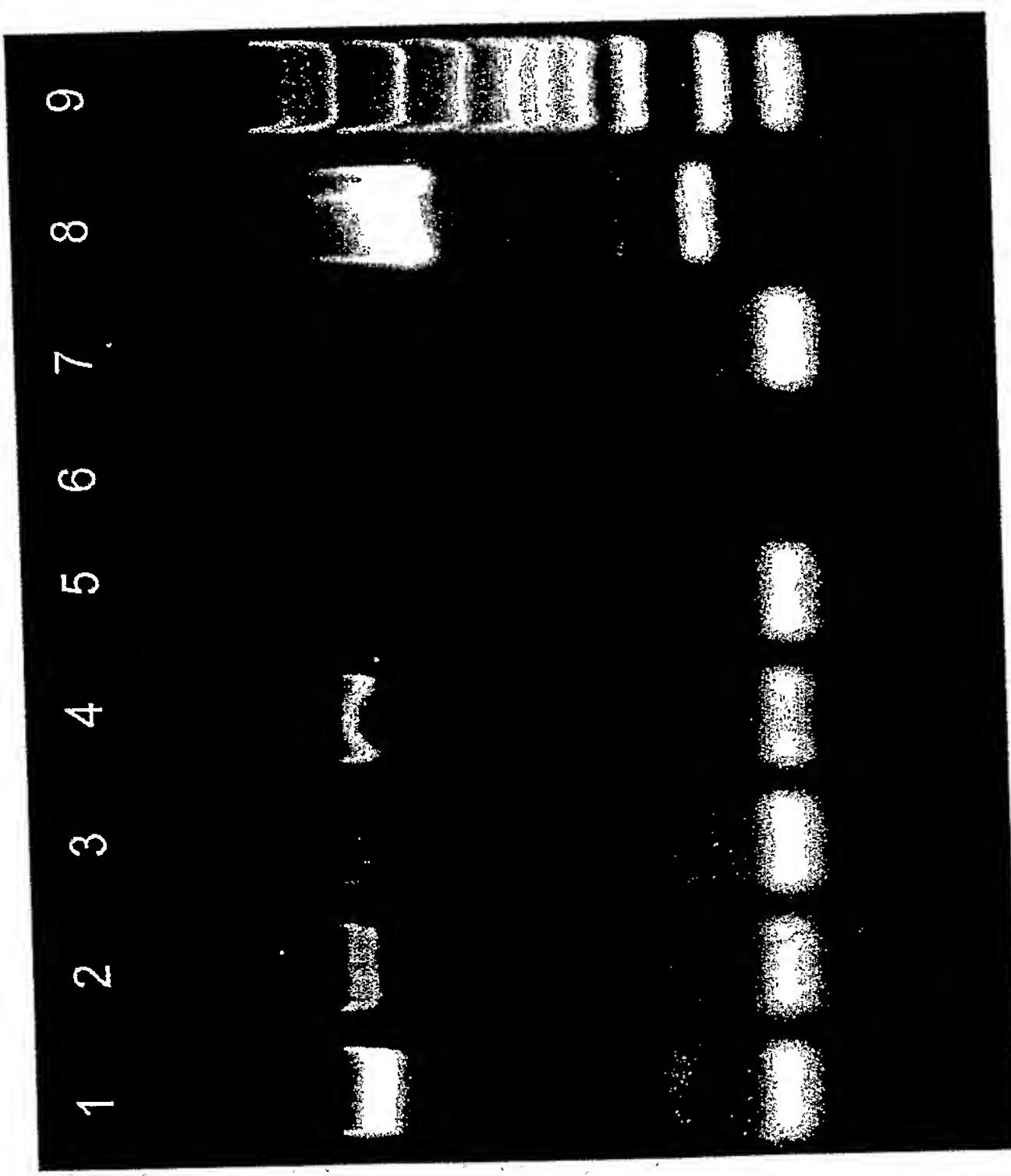


Legende:

- | | |
|--|------------------|
| 1 E ₁ (E= Elutionsfraktion) | 6 vor Säule |
| 2 E ₂ | 7 pos. Kontrolle |
| 3 E ₃ | 8 pGEM- Marker |
| 4 E ₄ | |
| 5 E ₅ | |

Figur 2

Ergebnisse der PCR nach Anreicherung prokaryotischer DNA aus DNA- Gemisch von *Staphylococcus aureus* und human DNA unter Verwendung von gekoppeltem CpG-181 Protein an AH- Sepharose



Legende:

1 E_1 ($E =$ Elutionsfraktion)	6	negative Kontrolle
2 E_2	7	vor Säule
3 E_3	8	positive Kontrolle
4 E_4		BIORAD- Marker
5 E_5	9	